

PCT/JP00/05590

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

21.08.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第232966号

RECD 05 OCT 2000

WIPO

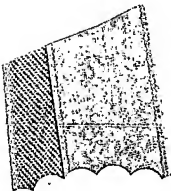
PCT

出 願 人

Applicant (s):

中外製薬株式会社

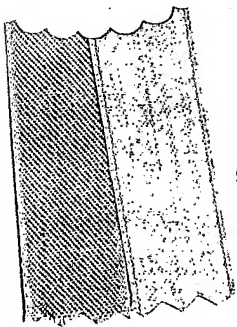
4



PRIORITY
DOCUMENT

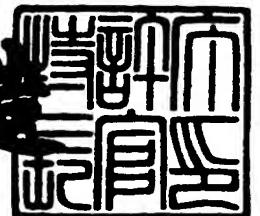
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3075953

【書類名】 特許願

【整理番号】 991605

【提出日】 平成11年 8月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

【住所又は居所】 広島県広島市東区牛田早稲田 3 - 6 - 9 - 5 0 1

【氏名】 加藤 幸夫

【発明者】

【住所又は居所】 広島県広島市南区旭 1 - 3 - 1 1 - 2 0 2

【氏名】 藤本 勝巳

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100091638

【弁理士】

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705604

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 軟骨形成促進剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) を含む軟骨形成促進剤。

【請求項 2】 MTf がウサギ p 7 6 タンパク質、ヒト p 9 7 タンパク質、及び p 7 6 タンパク質もしくは p 9 7 タンパク質をコードする DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質からなる群より選択される請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 3】 MTf が以下のものから選択される請求項 1 記載の軟骨形成促進剤：

- 1) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；及び
- 3) 配列番号：2 又は 4 のタンパク質をコードする DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 MTf がヒト p 9 7 タンパク質である請求項 2 記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 5】 MTf がその GPI アンカー領域を欠損したものである、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 6】 MTf が可溶性 MTf である請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 7】 以下のいずれかのタンパク質をコードする DNA が組み込まれた発現ベクターを有効成分として含有する、軟骨形成を促進するための遺伝子治療剤：

- 1) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
 - 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
 - 3) 配列番号：2 又は 4 のタンパク質をコードする DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を
-

有するタンパク質；

4) 上記 1)、2) 又は 3) 記載のタンパク質から G P I アンカー領域を欠損させたタンパク質。

【請求項 8】 MTf を活性化する物質と併用する請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 9】 インスリンあるいはインスリン様成長因子と併用する請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 1 0】 O A (変形性関節症) ; R A (リウマチ様関節炎) ; 外傷による関節軟骨損傷 ; 自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持 ; 耳、気管、鼻の軟骨の再建 ; 離断性骨軟骨炎 ; 椎間板、半月板の再生 ; 骨折及び軟骨からの骨形成からなる群より選択される軟骨分化が関与する骨疾患を治療するための請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の軟骨形成促進剤。

【請求項 1 1】 MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤。

【請求項 1 2】 MTf のアンタゴニストが抗 MTf 抗体又は MTf をコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である請求項 1 1 記載の軟骨分化抑制剤。

【請求項 1 3】 以下の工程を含んでなる、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法：

1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞に MTf を過剰発現させた細胞株を調製し、；

2) 候補物質を工程 1) で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして

3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質から MTf を活性化する物質を選択する。

【請求項 1 4】 請求項 1 3 記載の方法によって得られる MTf を活性化する物質。

【請求項 1 5】 請求項 1 3 記載の方法によって得られる MTf を活性化する物質を含む軟骨形成促進剤。

【請求項 1 6】 G P I アンカー領域を欠損した MTf。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規な軟骨形成促進剤に関する。さらに詳しくは、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (membrane-bound transferrin-like protein: 以下においてMTfということもある) を含む軟骨形成促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

動物の軟骨組織は軟骨細胞 (chondrocytes) と細胞間基質 (matrix) により構成されている。軟骨組織は胎生期の骨格の大部分を占めており、出生後は軟骨性骨化により、骨組織に置き換わってゆく。軟骨性骨化を開始するにあたって、軟骨細胞は静止軟骨細胞から増殖軟骨細胞となり、ついで肥大性軟骨細胞に分化していく (文献; 津田ら編集「骨の科学」1982年、東京医歯薬出版、p.11~29)。このように軟骨細胞は特に成長期の骨組織形成にとって必須な細胞であることがよく知られてきた。しかし軟骨細胞の分化や軟骨性骨化についてはまだ未解明の領域が多い。

【0003】

軟骨細胞膜には独自の糖蛋白が存在し、その膜蛋白が他の結合組織の細胞とは異なる軟骨細胞の特徴 (球形の細胞形態、軟骨マトリックスの大量分泌、軟寒天内での生存、増殖など) に寄与している可能性がある。この仮説に基づいて、ヤン (Yan) ら (Yan et al.; J. Biol. Chem., vol.265, p.10125~10131, 1990) 及び加藤ら (加藤ら、日本骨代謝学会雑誌、vol.10, No.2, p.187~192, 1992) は種々のレクチンの軟骨細胞の分化、増殖に対する効果を調べ、中でもタチナタマメレクチンであり α -D-マンノース残基および α -D-グルコース残基に親和性を有するコンカナバリンA (concanavalin A: 以下においてCon Aということもある) が軟骨細胞の分化を強く促進することを、プロテオグリカン (proteoglycan) の合成を増大させることなどを指標として明らかにしている。Con Aで処理された軟骨細胞は、未熟な扁平形態から分化した球形に変化し、軟骨分化マーカーであるプロテオグリカン及びI型コラーゲン産生、アルカリホスファターゼなどの発現、さらには石灰化を誘導する。このような分化誘導作用は他のレ

クチンでは見られない。

【0004】

河本ら (Kawamoto et al., Eur. J. Biochem. vol.256, p.503-509, 1998) はさらに、Con Aの作用を仲介するレセプターを探索する試みの中で、軟骨細胞上に存在する約20種類のCon A結合蛋白のうちで、レチノイン酸処理した軟骨細胞（脱分化し、Con A反応性を消失する）において発現が低下する76kDaの蛋白（p76）に注目した。ウサギ軟骨細胞膜分画よりCon Aアフィニティーカラムクロマトグラフィーにてp76を精製した後、N末部分アミノ酸配列を決定、遺伝子をクローニングした。アミノ酸配列及びそのcDNAの核酸配列から、p76は、ヒトのメラノーマなどの腫瘍に高発現されている腫瘍抗原として知られていたメラントランスフェリン（p97）と87%のアミノ酸相同性を示し、そのカウンターパートであると考えられた。従来、p97の生理的機能は不明であり、その発現も腫瘍細胞でのみ高く、正常組織ではほとんど検出されないと報告されていた。

【0005】

p76はCon Aとの結合性から軟骨細胞の分化あるいはその機能発現に関与していることが推定されたが、これらのタンパク質が実際に軟骨細胞又はその前駆細胞にどのような影響を及ぼすかについては何ら確認されていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、軟骨細胞の分化に関連する物質を明らかにし、さらにはこれを用いた新規な軟骨形成促進剤を提供することである。本発明は、軟骨細胞の機能の制御、及びゆくゆくは骨形成の促進をつかさどる物質の発明につながるものであり、このような物質は新しいタイプの軟骨代謝性疾患および骨代謝性疾患の治療、予防、診断につながるものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために、鋭意研究した結果、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (membrane-bound transferrin-like protein: MTf) 遺伝

子を、軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しないマウス ATDC 5 細胞株に導入して高レベルで発現させたところ、軟骨への分化を著しく誘導することを見出して本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) を含む軟骨形成促進剤を提供する。

MTf としては、ウサギ p 76 タンパク質、ヒト p 97 タンパク質、及び p 76 タンパク質もしくは p 97 タンパク質をコードする DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質が好ましく、特にヒト p 97 タンパク質が好ましい。

【0009】

MTf は以下のものから選択されるのが特に好ましい：

- 1) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；及び
- 3) 配列番号：2 又は 4 のタンパク質をコードする DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質。

【0010】

本発明はさらに、MTf がその GPI アンカー領域を欠損したものである前記軟骨形成促進剤を提供する。

本発明の軟骨形成促進剤は MTf を活性化する物質及び／又はインスリンと併用するとさらに効果が高められる。

【0011】

本発明の軟骨形成促進剤は、以下の疾患に有用である：OA (変形性関節症)；RA (リウマチ様関節炎)；外傷による関節軟骨損傷；自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持；耳、気管、鼻の軟骨の再建；離断性骨軟骨炎；椎間板、半月板の再生；骨折及び軟骨からの骨形成。

【0012】

本発明はさらに、以下のいずれかのタンパク質をコードする DNA が組み込ま

れた発現ベクターを有効成分として含有する、軟骨形成を促進するための遺伝子治療剤を提供する：

- 1) 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 3) 配列番号：2又は4のタンパク質をコードするDNAと緊縮条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質；
- 4) 上記1)、2)又は3)記載のタンパク質からGPIアンカー領域を欠損させたタンパク質。

【0013】

本発明はさらに、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤を提供する。

MTfのアンタゴニストは、抗MTf抗体又はMTfをコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体であることが好ましい。

【0014】

本発明はさらに、以下の工程を含んでなる、MTfを活性化する物質のスクリーニング方法を提供する：

- 1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞にMTfを過剰発現させた細胞株を調製し、；
- 2) 候補物質を工程1)で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして
- 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質からMTfを活性化する物質を選択する。

【0015】

本発明はさらに、上記方法によって得られるMTfを活性化する物質を提供する。

本発明はさらに、上記方法によって得られるMTfを活性化する物質を含む軟骨形成促進剤を提供する。

【0016】

本発明はさらに、GPIアンカー領域を欠損したMTfを提供する。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明において、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) とは、Con Aと結合する軟骨細胞膜上のタンパク質であって、かつトランスフェリンのような鉄結合サイトを有するタンパク質をいう。さらに好ましくは、Con Aによる軟骨分化誘導を仲介する機能を有するタンパク質をいう。

【0018】

MTfという用語は従来、メラノーマなどの腫瘍に高発現されている腫瘍抗原として知られていたメラノトランスフェリン (p 97) の略語として使用されていたが、p 97が癌組織以外に軟骨で特に高レベルで発現しており、癌組織に特異的でないことが判明したので、本発明者らはMTf (membrane-bound transferrin-like protein) に対してMTfという用語を再命名した。

【0019】

本発明において、MTf活性とは、未分化な細胞に対して軟骨分化を誘導し、軟骨細胞に対してその機能発現を促進する活性をいう。

MTfの例としては、ウサギ p 76 タンパク質、ウサギ p 76 タンパク質のヒト相同体タンパク質である p 97 タンパク質、ならびにこれらのタンパク質のアミノ酸の一部を欠失、置換、付加したものであって、MTf活性を有するタンパク質、あるいは p 76 タンパク質もしくは p 97 タンパク質をコードするDNAと緊縮条件下 (例えば、標準的な方法としては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されているように、6xSSC, 0.5% SDS, 10mM EDTA, 5xDenhardt's solution, 10mg/ml denatured salmon sperm DNAの溶液中で68℃でハイブリダイゼーションを行う) でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質が挙げられるが、これに限定されない。

【0020】

ウサギ p 76 タンパク質は、ヒト p 97 タンパク質と相同であり、ウサギ p 97 と称されることもある (Kawamoto et al., Eur. J. Bi chem. vol.256, p.503

-509, 1998)。その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号：1及び2に示す。ヒト p 9 7 タンパク質の塩基配列及びアミノ酸配列も公知である (Rose, T.M. et al., Pro NAS 83, 1261-65, 1986)。その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号：3及び4に示す。

【0021】

p 7 6 / p 9 7 タンパク質は、C末端アミノ酸のカルボキシル基に糖脂質 G P I (グリコシルホスファチジルイノシトール) を結合し、これをアンカーとして膜につなぎ止められている、G P I アンカー型タンパク質である (p 7 6 については、尾田 良、広島大学歯学雑誌、29巻、1号、40-57, 1997; p 9 7 については Alemany, R. et al., J. Cell Science, 104, 1155-62, 1993)。後述する実施例で示すように、全長の MTf のみならず、G P I アンカー部分を欠損した MTf あるいは可溶性の MTf であっても軟骨分化誘導活性が確認された。従って、本発明では、このような G P I アンカー欠損型 MTf も軟骨形成促進剤として使用できる。

【0022】

本発明で使用する MTf は天然型であっても組換え型であってもよく、それぞれ当業界に公知の方法で入手できる。以下に例示する。

天然型

MTf を得るには、例えば特開平 7 - 8 2 2 9 7 号に記載の方法により軟骨細胞から得ることができる。簡単に述べると、軟骨細胞の材料としては、種々の動物の軟骨組織を使うことができるが、例えばウサギの肋軟骨成長板を材料として、加藤らの方法 (Kato et al.; J. Cell Biol., vol. 100, p.477~485, 1985) に従い、プロテアーゼ及びコラゲナーゼ処理により軟骨細胞を得ることができる。この分離された軟骨細胞は培養皿でウシ胎児血清 (FCS) を含む培地で 5 % C O₂、9 5 % 空気的环境下で 3 7 °C で培養できる。この軟骨培養細胞を回収しホモジナイザーで破碎し、1 7 % / 4 0 % のショ糖平衡密度勾配による沈降平衡遠心により、膜蛋白を分取することができる。得られた膜蛋白画分を直接にコンカナバリン A ・アフィニティカラムに展開するか、または、あらかじめコンカナバリン A 以外のレクチンに結合する膜蛋白を除くために、例えば、代表的なレクチ

ンである小麦胚芽レクチン (Wheat germlectin) のアフィニティカラムに一旦展開した後、コンカナバリン A・アフィニティカラムに展開する等の方法を使うことにより、コンカナバリン A 結合蛋白分画をさらに分取することができる。種々の濃度のレチノイン酸で誘導した脱分化型軟骨細胞を作成し、これら脱分化型細胞からもコンカナバリン A 結合蛋白分画を分取する。この得られたコンカナバリン A 結合蛋白の軟骨細胞に対する特異性は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、これらの分画を比較することで検討できる。目的とする軟骨細胞に特異的な糖蛋白質が特定できたらゲルから目的のバンドを切り出し、エレクトロエリユーション等により抽出精製し、エンドグリコシダーゼを用いて糖蛋白質の糖質を分析できる。

組換え型

組換え型 MTf は、本発明の実施例に記載の方法あるいはこれに準じた方法を用いて、MTf 遺伝子を組み込んだプラスミドを宿主細胞にトランスフェクションして、MTf タンパク質を発現させることにより得ることができる。

【0023】

しかし、これに限定されることなく、当業界で公知の種々の形質転換法、宿主細胞を使用することができる。例えば、MTf をコードする遺伝子を適当なベクターに組み込むことにより、原核細胞または真核細胞の宿主細胞を形質転換することができる。

【0024】

さらに、これらのベクターに適当なプロモーターや形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子が発現することが可能である。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質として発現させ、精製を容易にしたり、発現量を上げたり、また精製工程において適当な処理を施すことにより、目的タンパク質を切り出すことも可能である。

【0025】

一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように、多形現象を示すと考えられ、この多形現象によって 1 個またはそれ以上のア

ミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

【 0 0 2 6 】

また、配列表の配列番号 2 又は 4 のアミノ酸配列中の 1 個またはそれ以上のアミノ酸を欠くかまたは付加したポリペプチド、あるいはアミノ酸が 1 個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでも細胞周期調節活性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン 2 (I L - 2) 遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドが I L - 2 活性を保持することも既に公知になっている (Wang et al., Science 24:1431, 1984)。これらの M T f タンパク質をコードする遺伝子の改変体を作製する技術は当業者には公知である。

【 0 0 2 7 】

また、真核細胞で発現させた場合、その多くは糖鎖が付加され、アミノ酸を 1 個ないしそれ以上変換することにより糖鎖付加を調節することができるが、この場合でも軟骨細胞分化誘導活性を有することがある。それゆえ、本発明では M T f タンパク質をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて、得られたポリペプチドが軟骨細胞分化誘導活性を有する限り、それらのポリペプチドをコードする遺伝子はすべて本発明に使用できる。

【 0 0 2 8 】

発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、プロモーター、RNA スプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを含むことができる。

発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌などが挙げられる。また、真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばイースト、粘菌が挙げられる。あるいは、S f 9 などの昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。さらに、動物細胞由来の宿主細胞としては、例えば、C O S 細胞、C H O 細胞などが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

以上のようにして M T f タンパク質をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養することにより産生されたタンパク質は細胞内または細胞外から分離し

、精製することができる。なお、上述した配列表の配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子で得られたタンパク質のみならず、配列表の配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列の一部を置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含む遺伝子を用いて得られたタンパク質であってもMTfタンパク質の生物学的機能、即ち細軟骨細胞分化誘導活性を有する限りは本発明の軟骨形成促進剤に使用できる。

【0030】

なお、MTfタンパク質の分離、精製には通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用することができる。例えば、各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析などを適宜選択、組み合わせて使用することができる。

【0031】

本発明の軟骨形成促進剤は、上述したMTfをタンパク質の形で投与してもよく、あるいは遺伝子治療として使用することも可能である。

また、軟骨分化物質としては従来インスリンあるいはインスリン様成長因子が知られていたが、本発明の軟骨形成促進剤はインスリンの非存在下においても軟骨分化を誘導した。ただし、インスリンの存在下ではその効果がさらに強く観察されたので、MTfとインスリンあるいはインスリン様成長因子を併用することにより、軟骨修復作用をさらに強化することが期待できる。

【0032】

さらに、軟骨細胞培養上清を添加すると、MTf過剰発現株で著しい軟骨細胞の分化が観察され、軟骨細胞培養上清にMTfを活性化する物質が存在することが示唆された。従って、MTfとMTfを活性化する物質を併用することにより、軟骨修復作用をさらに強化することが期待できる。

【0033】

MTfを活性化する物質は例えば以下の方法によって取得することができる：

- 1) 軟骨細胞培養系の培養上清から精製する；
- 2) MTfと結合するタンパク質のcDNAを軟骨細胞cDNAライブラリーからクローニングする；

3) イースト two hybrid法でMTfと結合するタンパク質の cDNA をクローニングする。

【0034】

また、種々の候補物質からMTfを活性化する物質をスクリーニングするには以下の工程を含む方法を用いることができる：

- 1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞にMTfを過剰発現させた細胞株を調製し、；
- 2) 候補物質を工程1)で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして
- 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質からMTfを活性化する物質を選択する。

【0035】

このようにして得られるMTf活性化物質はそれ自体として軟骨形成促進剤に使用できる。

さらに、GPIアンカー領域を欠損したMTfは、可溶性であり、軟骨形成促進剤に使用できる。

【0036】

本発明の軟骨形成促進剤が適用できる疾患には以下のものが挙げられる：

- 1) OA (変形性関節症)
- 2) RA (リウマチ様関節炎)
- 3) 外傷による関節軟骨損傷
- 4) 自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持
- 5) 耳、気管、鼻の軟骨の再建
- 6) 離断性骨軟骨炎
- 7) 椎間板、半月板の再生
- 8) 骨折
- 9) 軟骨からの骨形成

本発明の軟骨形成促進剤は一般には、MTfタンパク質もしくはMTf変異体（改変体）を導入した遺伝子治療として使用するのに有用である。本発明の遺伝子治療剤には、以下のいずれかのタンパク質をコードするDNAが組み込まれた発現ベ

クターを有効成分として含有する：

- 1) 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 3) 配列番号：2又は4のタンパク質をコードするDNAと緊縮条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質；
- 4) 上記1)、2)又は3)記載のタンパク質からGPIアンカー領域を欠損させたタンパク質。

【0037】

MTf変異体をコードするDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発やPCR法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edt., 15章, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、PCR A Practical Approach, IRL Press 200-210(1991)) 等の手法により、当業者ならば容易に作製することができる。

【0038】

本発明における細胞導入用のDNAとして、MTfあるいはMTf変異体発現ベクターを用意する。発現ベクターは、MTfあるいはMTf変異体をコードするDNAを、例えばpSG5 (ストラタジーン社) 等の発現ベクターに連結することにより作製できる。次に、上記の導入用DNA混合物を細胞内に導入する。細胞としては、例えば骨髄間質細胞、線維芽細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、滑膜細胞、脱分化した軟骨細胞が挙げられる。細胞へのDNAの導入法としては、例えばリン酸カルシウム法 (横田崇・新井賢一編、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社、1994) が挙げられる。従って、該DNAを医薬の有効成分とすることにより、軟骨形成促進作用を有する遺伝子治療剤を調製することができる。このような遺伝子治療剤を投与すると、細胞内でMTfまたはその変異体が高発現し、該細胞内における軟骨の分化誘導作用を促進することが考えられる。従って本発明のMTf遺伝子治療剤は、前記した各種疾患の治療又は予防剤となる。

【0039】

本発明の遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法 (日経サイエ

ンス,1994年4月号,20-45頁、実験医学増刊,12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」,羊土社(1996))のいずれの方法も適用することができる。

【0040】

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス等のDNAウイルス、又はRNAウイルスに、MTfあるいは変異MTfをコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0041】

また本発明の遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある(日経サイエンス,1994年4月号,20-45頁、月刊薬事,36(1),23-48(1994)、実験医学増刊,12(15)(1994))。 *in vivo*法がより好ましい。

【0042】

*in vivo*法により投与される場合は、疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、関節内注射、関節軟骨欠損部に直接塗布、埋め込み(パテ、ポリ乳酸など)、関節内徐放剤などの方法で投与できるが、静脈内注射も可能である。*in vivo*法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソームにした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

【0043】

また、GPIアンカーを含まない可溶性タンパク質(GPIアンカー欠損型MTf)あるいは前述したMTf活性化物質の場合には、これらの投与法に加えて、タ

ンパク質自体を種々の投与方法で投与することができ、さらにはこれを軟骨前駆細胞に添加することでも分化を誘導しうられる。

【0044】

本発明の軟骨形成促進剤の投与量は、治療すべき疾患の種類、重症度や患者の年齢、体重などを考慮して、具体的には医師により決定される。GPIアンカーを含まない可溶性タンパク質（GPIアンカー欠損型MTf）あるいは前述したMTf活性化物質の場合には、一般的には1ng～1000mg/日、好ましくは1（g～100mg/日である。

【0045】

本発明はさらに、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤を提供する。MTfのアンタゴニストとしては、抗MTf抗体又はMTfの塩基配列に基づいたアンチセンスDNA等を挙げることができる。

【0046】

アンチセンスDNAは、MTfをコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である。

アンチセンスDNAは、mRNAに対して相補的塩基配列をもち、mRNAと塩基対を形成することにより、遺伝情報の流れを遮断し、最終産物であるMTfの合成を抑制する。本発明において使用できるアンチセンスDNAは、配列表の配列番号2又は4に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と特異的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドである。

【0047】

ここで「オリゴヌクレオチド」の語は、天然に存在する塩基および本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分から生成されたオリゴヌクレオチドおよびその類似体を意味する。したがって、この用語が含む第1の群は、天然に存在する種または天然に存在するサブユニットまたはそれらの同族体から生成された合成種である。また、サブユニットとは隣接するサブユニットに対してホスホジエステル結合または他の結合によって結合した塩基-糖の組み合わせをいう。またオリゴヌクレオチドの第2の群はその類似体であり、これはオリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在していない部分を有する残基を意味する。

これらには、安定性を増加するためにリン酸基、糖部分、3'，5' 末端に化学修飾を施したオリゴヌクレオチドを含む。例えば、ヌクレオチド間のホスホジエステル基の酸素原子の1つを硫黄に置換したオリゴホスホロチオエート、 $-CH_3$ に置換したオリゴメチルホスホネートなどが挙げられる。また、ホスホジエステル結合は、非イオン性かつ非キラル性である他の構造で置換されていてもよい。さらに、オリゴヌクレオチド類似体としては、修飾された塩基形態、すなわち天然に通常見いだされるもの以外のプリンおよびピリミジンを含む種を用いてもよい。

【0048】

本発明で使用するオリゴヌクレオチドは、好ましくは5～40個、さらに好ましくは8～30個、より好ましくは12～30個のサブユニットを有する。

本発明においては、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするmRNAの標的部分は転写開始部位、翻訳開始部位、イントロン／エキソン結合部位または5' キャップ部位が好ましいが、mRNAの二次構造を考慮して立体障害のない部位を選択すべきである。

【0049】

さらに、本発明においてはオリゴヌクレオチドに代えて、ペプチド核酸(例えば、Bioconjugate Chem. Vol.5, No.1, 1994を参照)を用いることもできる。

本発明の特に好ましい態様は、配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列とハイブリダイズし、MTfの発現を阻害しうるオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸である。

【0050】

本発明によるオリゴヌクレオチドは、当業界で公知の合成法、例えばApplied Biosystems社などの合成装置を用いる固相合成法によって製造できる。同様の方法を用いて、他のオリゴヌクレオチド類似体、例えば、ホスホロチオエートやアルキル化誘導体を製造することもできる(村上 章ら、「機能性アンチセンスDNAの化学合成」、有機合成化学、48(3):180-193、1990)。

【0051】

本発明で使用する抗MTf抗体は、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列のうち

、少なくとも5個の連続するアミノ酸を有するペプチドを認識する抗体であり、定法（例えば、新生化学実験講座1、タンパク質I、p. 389-397、1992参照）を用いて、抗原となる配列表の配列番号2又は4に示すアミノ酸配列のうち、少なくとも5個の連続するアミノ酸を有するペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗体にはポリクローナル及びモノクローナル抗体を含み、これらの作製方法も当業者に公知である。

【0052】

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されない。当業者には種々の変更、修飾が可能であり、これらも本発明の範囲に含まれる。

【0053】

【実施例】

実験材料および方法

ウサギ軟骨細胞の培養

軟骨細胞は加藤らの方法（Kato et al.; J. Cell Biol., vol. 100, p.477~485, 1985）に準じてウサギ肋軟骨から単離した。すなわち、生後4週齢の雄性日本白色家兎（広島実験動物）の肋骨の静止軟骨部を分離し、メスにて細切した後、8mg/mLアクチナーゼE（科研製薬）と5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、Flow Laboratories社）にて1時間、0.15%コラゲナーゼ（Worthington Biochemical社）を含むDMEMにて3時間インキュベートした後、120 μ mナイロンフィルターを通過する細胞を回収した。本細胞を細胞培養用プラスチックシャーレー（Corning社）に播種し、37℃、5%CO₂気相下にて10%ウシ胎児血清（三菱化成）、50 μ g/mLアスコルビン酸、50U/mL LGカリウム、60 μ g/mLカナマイシン（以上、明治製菓）、250 μ g/mLアンホテリシンB（ICN Biochemical社）を含むアルファ変法イーグル培地（ α -MEM、三光純薬）（medium A）または、無血清のDMEM（medium B）中で培養した。

マウス軟骨前駆細胞株ATDC5の培養

ATDC5は理研細胞銀行（筑波、日本）より購入した。細胞は5%ウシ胎児血清（FCS三菱化成）、10 μ g/mLヒトトランスフェリン（Boehringer Mannheim社）および0.3nmol/mL亜セレン酸ナトリウム（和光純薬）を含むハムF-12培地（Flow Laboratories社）とダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、Flow Laboratories社）を1:1で混合した培地（維持培地）にて、37℃、5%CO₂気相下で培養した。軟骨分化を誘導する場合は、この維持培地に10 μ g/mLウシインスリン（Sigma社）を加えた培地（分化培地）でATDC5細胞を培養した。

ウサギMTfのcDNAクローニングと塩基配列の決定

コンフルエントに達して3日後のウサギ軟骨細胞からグアニジンチオシアネート法によってtotal RNAを抽出した。このtotal RNA 1 μ gからreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって2本鎖のcDNAを合成した。そしてヒトMTf (Rose, T.M. et al., Pro NAS 83, 1261-65, 1986) の塩基配列に基づいて5'-GGCTGGAACGTGCCCCGTGGGCTA-3' (forward) (配列番号: 5)、5'-GTCTGGGGCCTTGTCCAGCAGTC-3' (reverse) (配列番号: 6) のプライマー対を設計し、このプライマーを用いて2本鎖のcDNAより1.5kbのMTfcDNA断片を増幅した。得られたcDNA断片をpBluescript II SKベクター (Stratagene社) のSmaI切断部に組み込んでクローン化し、Sequenase7-deaza-dGTP DNA sequencing kit (USB社) を用いて塩基配列を決定した。次に完全長のcDNAを得るためにMarathon cDNA amplification kit (Clontech社) を用いてrapid amplification of cDNA end (RACE)を行った。具体的にはウサギ軟骨細胞の2本鎖total cDNAにMarathon cDNAアダプターをライゲーションして、アダプタープライマーと上記で判明したMTfの塩基配列より設計した特異的プライマー (5'-AGAGGGACTCCGAGTATCTGGTCTC-3' (forward) (配列番号: 7) と5'-GTCCGGCCCGACACCAACATCTTC-3' (reverse) (配列番号: 8)) を用いてRACEを行った。この増幅されたcDNAサンプルを4.5%アクリルアミドゲルにて分離して、そのcDNAの主要バンドをゲルから抽出し、pBluescript II SKベクターに組み込んでクローン化した。それらをテンプレートとしてSequenase7-deaza-dGTP DNA sequencing kitおよびABI autosequencer (ABI社) を用いて、MTf全長の塩基配列を決定した。

MTf強制発現ATDC5変異株の作製

ウサギMTf cDNA (Kawamoto T. et al., EJB 1998) の全長あるいはC-末端の GPIアンカー結合に必要な28残基に対応する部位を削除したものをpcDNA3.1/Zeo (+)プラスミド発現ベクター (サイトメガロウイルス極初期プロモーター/エンハンサーを含む: Invitrogen社, San Diego, CA) に組み込んだ。すなわち、全長を含むEcoRI-NotIフラグメントをベクターより切り出し、pcDNA3.1/Zeo (+) のEcoRI-NotI部位に組み込んだ。また、GPIアンカー結合部位を欠失した変異株を作製するには、PCR法によりC-末端の28アミノ酸手前にストップコドン挿入したフラグメントを作製し、配列の確認を行った後、pcDNA3.1/Zeo (+) のEcoRI-NotI部位に組み込んだ。

【0054】

このようにして全長のMTf cDNA (MTf Full) とGPIアンカーの欠失したMTf cDNA (MTf(-)GPI) を挿入したプラスミド (pMTf FullあるいはpMTf (-)GPI) を作製し、それぞれATDC5細胞 (理研、筑波、日本) にトランスフェクションした。トランスフェクションにはSuperFect Transfection Reagent (QIAGEN)を用いた。ゼオシン (Zeocin: Invitrogen社) により選択し、安定なトランスフォーマントを作製した。

【0055】

具体的には、ATDC5細胞を10 cmシャーレに 2×10^5 個の細胞を播種して、翌日、導入するプラスミドDNAを各 $2 \mu\text{g}$ (pMTf Full及びpMTf(-)GPI) とSuperFect Transfection Reagent溶液 $\sim 40 \mu\text{L}$ をそれぞれ個別に無血清培地に溶解した後、要時速やかに混合して、無血清培地にて洗浄した細胞に添加した。37℃、5%CO₂気相下で1時間培養後、血清培地を添加してさらに1日間培養した。なお、対照としてベクターのみをトランスフェクションした群も作製した。

【0056】

トランスフェクション1日後、ゼオシンを $50 \mu\text{g/mL}$ 含んだ血清添加培地で選択を開始し、2日おきに培地交換を行いながら2週間培養した。その結果、MTf FullおよびMTf(-)GPIを安定に発現するATDC5細胞変異株を得て、以後はゼオジンを5

0 μ g/mL 含んだ血清添加培地で継代した。

【0057】

なお、MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製手順の概略を図 1 に示す。

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf 遺伝子の発現

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf 遺伝子の発現は Northern blotting にて確認した。具体的には ATDC5 変異株よりグアニジンチオシアネート法によって total RNA を調製し、total RNA 10 μ g を 2.2 mol/L ホルムアルデヒドを含有する 1% アガロースゲル中にて電気泳動した後、Hybond-N membrane (Amersham 社) に転写した。このメンブレンを 32 P でラベルした 2.2 kb のウサギ MTf cDNA プロブで 42℃、16 時間ハイブリダイズした。メンブレンを洗浄後、BioMax X-ray film (Kodak 社) に -80℃ で露光してシグナルを検出した。得られた結果を図 2 に示す。

【0058】

その結果、MTf Full 株においてはクローンナンバー 1、4 および 5 においてウサギ MTf 遺伝子が強発現していることを確認した。

また、MTf (-) GPI 株においてはクローンナンバー 3、3 N、8、9 および 10 においてウサギ MTf 遺伝子が強発現していることを確認した。実施例では (-) GPI-3 を使用した。

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf タンパクの発現

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf タンパクの発現は Western Blotting にて確認した。具体的には ATDC5 変異株より膜画分タンパクを調製して、10 μ g/lane で SDS-PAGE を行い、polyvinylidene difluoride membraen (Milipore 社) に転写した。転写したメンブレンは 4% スキムミルクでブロッキングした後、抗 MTf 血清 (1:500 希釈; Eur. J. Biochem. 256, 503-509 (1998)) で 4℃、14 時間反応させた後、 125 I ヒツジ抗マウス IgG (Fab')₂ フラグメント (Amersham 社) で室温、2 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、BioMax X-ray film に -80℃ でエクスポーズして解析を行った。得られた結果を図 3 に示す。

その結果、MTf Full 株においてはクローンナンバー 1 および 5 においてウサギ MT

fタンパクが強発現していることを確認した。これらのクローンをMTf過剰発現株 (Full -1およびFull-5) と命名した。

実施例 1 : MTf過剰発現株における軟骨分化

MTf過剰発現株を6穴マルチウエルプレートに 4.0×10^4 個の細胞を播種して、維持培地にて37℃、5%CO₂気層下で培養した。

【0059】

MTf過剰発現株はMTf Full株においてMTfの遺伝子とタンパクの発現を確認したFull -1およびFull-5株について検討した。MTf(-)GPI株においては、MTfの遺伝子の発現を確認したGPI-3株について検討した。

【0060】

対照細胞として、ATDC5細胞及びpC-1 (ベクターのみ) を同様に調製し、顕微鏡で形態学的特徴を観察した。なお、細胞形態は、オリンパス位相差顕微鏡を用いて観察した。一つの培養系から2視野を写真にとり、少なくとも200個の細胞を数えて、球形化した細胞の割合を算定した。

【0061】

インスリン非存在下では対照細胞 (pC-1) は軟骨細胞に分化しないのに対して、MTf過剰発現株 (Full -1およびFull-5) 及びMTf(-)GPI株 ((-)GPI-3) は20日以内に分化を開始し、細胞播種29日目には細胞のほぼ全域が軟骨細胞に分化した (図4)。

【0062】

さらに、インスリン (10(g/mL) 存在下 (Day 0より添加) で、同様の試験を行った。インスリン非存在下のときと同様な結果が得られた (図5) が、MTf過剰発現株では、インスリン非存在下よりもさらに分化が誘導された。すなわち、インスリン非存在下よりも多くの細胞の細胞形態が軟骨細胞様に"round"していた。

【0063】

これらの結果から、MTfは軟骨の分化誘導を促進する効果があることが明らかとなり、その効果はインスリンの非存在下でも示された。

実施例 2 : ウサギ軟骨細胞の培養上清添加の効果

ウサギ軟骨細胞の培養上清は静止軟骨細胞 1×10^6 個の細胞を 10cm カルチャーディッシュに播種し、medium A (10mL) にて 37℃、5%CO₂ 気相下で培養した。コンフルエント後 2 日目に無血清の medium B (5mL) に交換して 24 時間後に、培養上清 (CM) を回収して実験に供した。なお、CM は回収後 5% になるようにウシ胎児血清を添加した。

【0064】

MTf 過剰発現株 (Full-5) および対照株 (pC-1) の細胞を、6 穴マルチウエルプレートに各 8.0×10^4 個/well になるように細胞を播種して、維持培地にて 37℃、5%CO₂ 気相下で培養した。コンフルエントに達した 3 日後 (Day 7) より、先に回収した CM を全体の培養液の 60% になるように添加し、同時に 10 μ g/mL ウシインスリンを添加して 37℃、5%CO₂ 気相下でさらに 48 時間培養した。

【0065】

CM 添加開始 48 時間後、CM を添加した MTf 過剰発現株 (Full-5(+))CM) はほぼすべての細胞が軟骨細胞に分化し、基質合成の盛んな敷石状の軟骨細胞の形態を示した。これに対し、CM 非添加の MTf 発現株 (Full-5(-))CM) は、対照細胞であるベクターのみを発現させた細胞株 (pC-2(+))CM) および (-))CM) とほぼ同じ細胞形態を示した。ベクターのみを発現させた細胞株では CM 添加による軟骨細胞の分化誘導は認められなかった (図 6)。

【0066】

これらの結果は CM 中に MTf を活性化する物質が存在すること意味する。

【0067】

【配列表】

- <110> 中外製薬株式会社
 - <120> 軟骨形成促進剤
 - <130> 991605
 - <160> 8
-

<210> 1

<211> 2388

<212> cDNA

<213> Rabbit

<400> 1

```

gccgccgtc actcgttcgc actcggactc agaccagtc cgacccctg gactgcgcca 60
tgcggtgccg aagcgcggct atgtggatct tcctggccct gcgcaccgca ctccggcagcg 120
tggaggtgcg gtggtgcacc gcgtccgagc ccgagcagca gaagtgcgag gacatgagcc 180
aggccttccg cgaagccggc ctccagcccg cctgtctgtg cgtgcagggc acctcggccg 240
accactgcgt ccagctcatc gcggcccacg aggccgacgc catcactctg gacggaggag 300
ccatttacga ggccggggaag gaacacggcc tgaagccgt ggtgggcgaa gtgtatgacc 360
aagaggtggg cacctcctac tacgtctgtg ccgtggatcaa gaggagetcc aacgtgaeca 420
tcaacaccct gagaggcgtg aagtcctgcc acacgggcat caaccgcacg gtgggctgga 480
acgtgcctgt gggctacctg gtggacagcg gccgcctctc agtgatgggc tgtgacgtgc 540
tcaaagcggg cagcgagtac ttccgggggca gctgcgtccc tggggcagga gagaccagat 600
actcggagtc cctctgtcgc ctctgccggg gcgacacctc cggggagggg gtgtgtgaca 660
agagccccct ggagcgggtac tacgactaca gcggggcctt ccggtgcctg gcagaaggcg 720
caggggacgt ggcctttgtg aagcacagca cggtgctgga gaacacggat gggagaacac 780
tgccctcctg gggccacatg ctgatgtcac gggactttga gctgctgtgc cgggacggca 840
gccggggccg cgtcaccgag tggcagcact gccacctggc ccgggtgccc gccacgccg 900
tgggtgtccg ggccgacacc gacgcaggcc tcattctccg gcttctcaat gagggccagc 960
ggctgttcag ccacgagggc agcagcttcc agatgttcag ctccgaggcc tacggccaga 1020
agaacctgct gttcaaagac tccacgtgg agctgggtgcc catcgccaca cagacctacg 1080
aggcctggct gggccccgag tacctgcacg ccatgaaggg tctgctctgt gaccccaacc 1140
ggctgcccc atacctgcgc tgggtcgtgc tgtccacccc cgagatccag aagtgtggag 1200
acatggccgt ggccttcagc cggcagaggc tcaagccgga gatccagtgt gtctcggcgg 1260
agtccccca gcactgcatg gagcagatcc aggctgggca catcgatgct gtgacctga 1320
acggggagga cattcacaca gcggggaaga cttatgggct gatcccggt gccggggagc 1380
tgtatgccgc ggacgacagg agtaactcgt acttcgtggt ggccgtgggtg aagcgagaca 1440

```

gcgccctacgc cttcaccgtg gacgagctgc gcgggaagcg ctcctgccac cccggcttcg 1500
gcagcccggc cggctgggac gtcccgggtg gcgccctcat ccactggggc tacatccggc 1560
ccaggaactg cgacgtcctc acagcgggtg gtcagttctt caacgccagc tgtgtgccgg 1620
tgaacaaccc caagaagtac cctcctcgc tgtgcgcact ctgcgtgggt gacgagcagg 1680
gccgcaacaa gtgcactggc aacagccagg agcgggtacta tggcgacagt ggcgccttca 1740
ggtgccttgt ggagggtgca ggggacgtgg ccttcgtcaa gcacacgacc atctttgaca 1800
acacaaatgg ccacaatccc gagccgtggg ctgccatct gaggagccag gactacgagc 1860
tgctgtgccc caacggcgcg cgagctgagg cgcaccagtt tgccgcctgc aacctggccc 1920
agattccgtc ccacgccgtc atggtgcggc ccgacaccaa catcttcacc gtttacggac 1980
tgctggacaa ggcccaggac ctgtttggag acgaccacaa caagaacggg ttcaagatgt 2040
tcgactcctc cagctaccac ggccgagacc tgctcttcaa ggacgccacg gtgcgcgctg 2100
tgcctgtggg cgagaggacc acctaccagg actggctggg gccggactac gtggcggctc 2160
tggaagggat gcagtcacag cggtgctcag gggcagccgt cggcgcccc ggggcctcgc 2220
tgctgccgt gctgcccctg gctgcgggcc tctgtctgc ttcgtctga gagcagcccc 2280
gggcagcctc ggccccggca ggggagcctg cgcggaagct tcctgaacga gcccgcgccc 2340
tggtggatg tggttacctc ggcgagccgc ggggccgcgc tcccccg 2388

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Rabbit

<400> 2

Met Arg Cys Arg Ser Ala Ala Met Trp Ile Phe Leu Ala Leu Arg Thr

1

5

10

15

Ala Leu Gly Ser Val Glu Val Arg Trp Cys Thr Ala Ser Glu Pro Glu

20

25

30

Gln Gln Lys Cys Glu Asp Met Ser Gln Ala Phe Arg Glu Ala Gly Leu

35

40

45

Gln Pro Ala Leu Leu Cys Val Gln Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val

50	55	60
Gln Leu Ile Ala Ala His Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly		
65	70	75
Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly		
85	90	95
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val		
100	105	110
Val Lys Arg Ser Ser Asn Val Thr Ile Asn Thr Leu Arg Gly Val Lys		
115	120	125
Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val		
130	135	140
Gly Tyr Leu Val Asp Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val		
145	150	155
Leu Lys Ala Val Ser Glu Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala		
165	170	175
Gly Glu Thr Arg Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp		
180	185	190
Thr Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr		
195	200	205
Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val		
210	215	220

Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Arg Thr		
225	230	235
Leu Pro Ser Trp Gly His Met Leu Met Ser Arg Asp Phe Glu Leu Leu		
245	250	255
Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Ser Val Thr Glu Trp Gln His Cys His		
260	265	270
Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp		
275	280	285

Ala Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser

290

295

300

His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln

305

310

315

320

Lys Asn Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Leu Glu Leu Val Pro Ile Ala

325

330

335

Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Pro Glu Tyr Leu His Ala Met

340

345

350

Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp

355

360

365

Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val

370

375

380

Ala Phe Ser Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala

385

390

395

400

Glu Ser Pro Gln His Cys Met Glu Gln Ile Gln Ala Gly His Ile Asp

405

410

415

Ala Val Thr Leu Asn Gly Glu Asp Ile His Thr Ala Gly Lys Thr Tyr

420

425

430

Gly Leu Ile Pro Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Ala Ala Asp Asp Arg Ser

435

440

445

Asn Ser Tyr Phe Val Val Ala Val Val Lys Arg Asp Ser Ala Tyr Ala

450

455

460

Phe Thr Val Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Pro Gly Phe

465

470

475

480

Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile His Trp

485

490

495

Gly Tyr Ile Arg Pro Arg Asn Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Gly Gln

500

505

510

Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Lys Tyr Pro

515	520	525
Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys		
530	535	540
Cys Thr Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Phe		
545	550	555
Arg Cys Leu Val Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr		
565	570	575
Thr Ile Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ala		
580	585	590
His Leu Arg Ser Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg		
595	600	605
Ala Glu Ala His Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Ser		
610	615	620
His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly		
625	630	635
Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn		
645	650	655
Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Ser Tyr His Gly Arg Asp Leu Leu		
660	665	670
Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Arg Thr Thr		
675	680	685
<hr/>		
Tyr Gln Asp Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met		
690	695	700
Gln Ser Gln Arg Cys Ser Gly Ala Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Ser		
705	710	715
Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ser Ser Leu		
725	730	735

<210> 3

<211> 2368

<212> cDNA

<213> Human

<400> 3

```

gcggacttcc tcggacccgg acccagcccc agcccggccc cagccagccc cgacggcgcc 60
atgcgggggtc cgagcggggc tctgtggctg ctcttggtc tgcgcaccgt gctcggaggc 120
atggagggtgc ggtggtgcgc cacctcggac ccagagcagc acaagtgcgg caacatgagc 180
gaggccttcc gggaagcggg catccagccc tccctcctct gcgtccgggg cacctccgcc 240
gaccactgcg tccagctcat cgcgggcccag gaggctgacg ccatcactct ggatggagga 300
gccatctatg aggcgggaaa ggagcacggc ctgaagccgg tggtaggcga agtgtacgat 360
caagaggctc gtacctccta ttacgccgtg gctgtggtca ggaggagctc ccatgtgacc 420
attgacaccc tgaaaggcgt gaagtcctgc cacacgggca tcaatcgac agtgggctgg 480
aacgtgcccc tgggctacct ggtggagagc ggccgcctct cggtagtggg ctgcgatgia 540
ctcaaagctg tcagcgacta ttttgggggc agctgcgtcc cgggggcagg agagaccagt 600
tactctgagt ccctctgtcg cctctgcagg ggtgacagct ctggggaagg ggtgtgtgac 660
aagagcccc tggagagata ctacgactac agcggggcct tccggtgcct ggcggaaggg 720
gcaggggacg tggcttttgt gaagcacagc acggtactgg agaacacgga tgggaagacg 780
cttccctcct ggggccaggc cctgctgtca caggacttcg agctgctgtg ccgggatggt 840
agccggggccg atgtcaccga gtggaggcag tgccatctgg cccgggtgcc tgctcacgcc 900
gtggtggtcc gggccgacac agatgggggc ctcatcttcc ggctgctcaa cgaaggccag 960
cgtctgttca gccacgaggg cagcagcttc cagatgttca gctctgaggg ctatggccag 1020
aaggatctac tcttcaaaga ctctacctcg gagcttgtgc ccatcgccac acagacctat 1080
gaggcgtggc tgggcatga gtacctgcac gccatgaagg gtctgctctg tgacccaac 1140
cggtgcccc cctacctgcg ctggtgtgtg ctctccactc ccgagatcca gaagigtgga 1200
gacatggccg tggccttccg ccggcagcgc ctcaagccag agatccagtg cgtgtcagcc 1260
aagtcccccc aacactgcat ggagcggatc caggctgagc aggtcgacgc tgtgacccta 1320
agtggcgagg acatttacac ggcggggaag aagtacggcc tggttcccgc agccggcgag 1380
cactatgccc cggaagacag cagcaactcg tactacgtgg tggccgtggt gagacgggac 1440
agctcccacg ccttcacctt ggatgagctt cggggcaagc gtcctgcca cgccggtttc 1500

```

ggcagccctg caggctggga tgtccccgtg ggtgccctta ttcagagagg cttcatccgg 1560
 cccaaggact gtgacgtcct cacagcagtg agcgagtctt tcaatgccag ctgcgtgccc 1620
 gtgaacaacc ccaagaacta cccctcctcg ctgtgtgcac tgtgcgtggg ggacgagcag 1680
 ggccgcaaca agtgtgtggg caacagccag gagcgggtatt acggctaccg cggcgccttc 1740
 aggtgccttg tggagaatgc gggtgacgtt gccttcgtca ggcacacaac cgtctttgac 1800
 aacacaaacg gccacaattc cgagccctgg gctgctgagc tcaggtcaga ggactatgaa 1860
 ctgctgtgcc ccaacggggc ccgagccgag gtgtcccagt ttgcagcctg caacctggca 1920
 cagataccac cccacgccgt gatgggccgg cccgacacca acatcttcac cgtgtatgga 1980
 ctgctggaca aggcccagga cctgttttga gacgaccaca ataagaacgg gttcaaaatg 2040
 ttcgactcct ccaactatca tggccaagac ctgcttttca aggatgccac cgtccggggc 2100
 gtgcctgtcg gagagaaaac cacctaccgc ggctggctgg ggctggacta cgtggcgggc 2160
 ctggaaggga tgtcgtctca gcagtgtcg ggcgagcggg ccccggcgcc cggggcgccc 2220
 ctgctccgc tgctgtgcc cgccctcgcc gccgcctgc tcccgccgc cctctgagcc 2280
 cggccgcccc gccccagagc tccgatgccc gcccggggag tttccgcggc ggcctctcgc 2340
 gctgcggaat ccagaaggaa gctcgcga 2368

<210> 4

<211> 738

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr

1 5 10 15

Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu

20 25 30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile

35 40 45

Gln Pr Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val

50 55 60

Gln	Leu	Ile	Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	Asp	Ala	Ile	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly
65					70					75					80
Ala	Ile	Tyr	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Val	Val	Gly
					85					90					95
Glu	Val	Tyr	Asp	Gln	Glu	Val	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Val	Ala	Val
					100					105					110
Val	Arg	Arg	Ser	Ser	His	Val	Thr	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Gly	Val	Lys
					115					120					125
Ser	Cys	His	Thr	Gly	Ile	Asn	Arg	Thr	Val	Gly	Trp	Asn	Val	Pro	Val
					130					135					140
Gly	Tyr	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Ser	Val	Met	Gly	Cys	Asp	Val
145					150					155					160
Leu	Lys	Ala	Val	Ser	Asp	Tyr	Phe	Gly	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Gly	Ala
					165					170					175
Gly	Glu	Thr	Ser	Tyr	Ser	Glu	Ser	Leu	Cys	Arg	Leu	Cys	Arg	Gly	Asp
					180					185					190
Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Val	Cys	Asp	Lys	Ser	Pro	Leu	Glu	Arg	Tyr	Tyr
					195					200					205
Asp	Tyr	Ser	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Ala	Glu	Gly	Ala	Gly	Asp	Val
					210					215					220
Ala	Phe	Val	Lys	His	Ser	Thr	Val	Leu	Glu	Asn	Thr	Asp	Gly	Lys	Thr
225					230					235					240
Leu	Pro	Ser	Trp	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Ser	Gln	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu
					245					250					255
Cys	Arg	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Glu	Trp	Arg	Gln	Cys	His
					260					265					270
Leu	Ala	Arg	Val	Pro	Ala	His	Ala	Val	Val	Val	Arg	Ala	Asp	Thr	Asp
					275					280					285
Gly	Gly	Leu	Ile	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Glu	Gly	Gln	Arg	Leu	Phe	Ser

290	295	300
His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln		
305	310	315
Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala		
325	330	335
Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met		
340	345	350
Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp		
355	360	365
Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val		
370	375	380
Ala Phe Arg Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala		
385	390	395
Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp		
405	410	415
Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Lys Tyr		
420	425	430
Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser		
435	440	445
Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala		
450	455	460

Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe		
465	470	475
Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg		
485	490	495
Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu		
500	505	510
Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro		
515	520	525

Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys
530 535 540

Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe
545 550 555 560

Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr
565 570 575

Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala
580 585 590

Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
595 600 605

Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro
610 615 620

His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly
625 630 635 640

Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
645 650 655

Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu
660 665 670

Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr
675 680 685

Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met
690 695 700

Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro
705 710 715 720

Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro
725 730 735

Ala Leu

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggctggaacg tgcccgtggg cta

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gtcctgggcc ttgtccagca gtc

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

agagggactc cgagtatctg gtctc

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gtccggcccg acaccaacat cttc

【図面の簡単な説明】

【図 1】

MTf強制発現ATDC5変異株の作製手順の概略を示す。

【図 2】

ATDC5細胞変異株におけるMTf遺伝子の発現を示すNorthern blottingの図である（電気泳動の写真）。

【図 3】

ATDC5細胞変異株におけるMTfタンパクの発現を示すWestern Blottingの図である（電気泳動の写真）。

【図 4】

インスリン非存在下における、対照細胞（pC-1）と MTf過剰発現株（ Full -1およびFull-5）の細胞播種29日目での軟骨細胞への分化の様子を示す写真（生物の形態を示す写真）である。

【図 5】

インスリン存在下における、対照細胞（pC-1）と MTf過剰発現株（ Full -1およびFull-5）の細胞播種29日目での軟骨細胞への分化の様子を示す写真（生物の形態を示す写真）である。

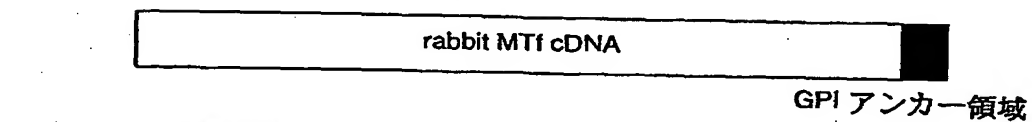
【図 6】

ウサギ軟骨細胞の培養上清添加の軟骨細胞分化誘導に及ぼす効果を示す写真（生物の形態を示す写真）である。

【書類名】 図面

【図 1】

発現ベクターの構築 (pc-DNA 3.1 (+) plasmid)



発現ベクター構築物

MTf Full



MTf (-) GPI



安定なトランスフェクション



Northern Blotting による MTf mRNA の発現チェック

Western Blotting による MTf タンパク質の発現チェック

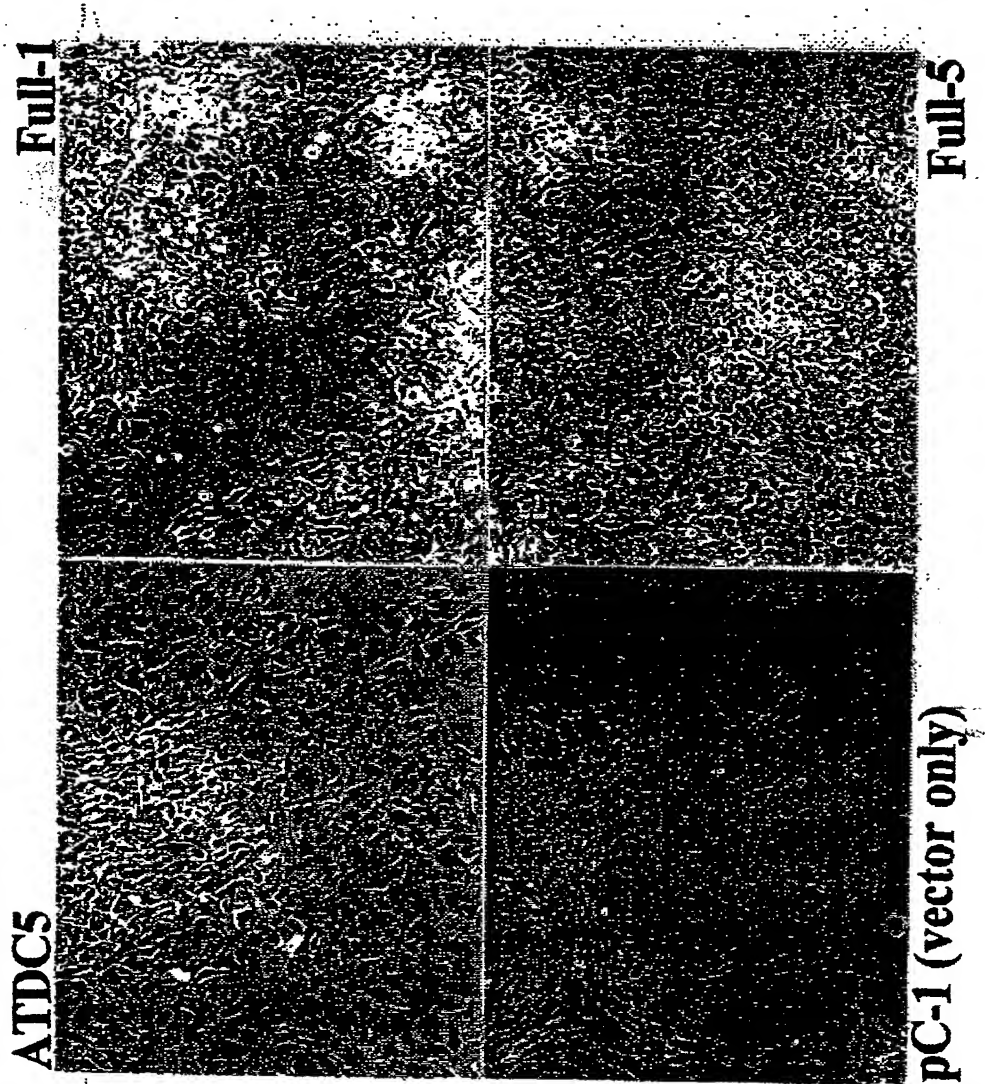
【図 2】



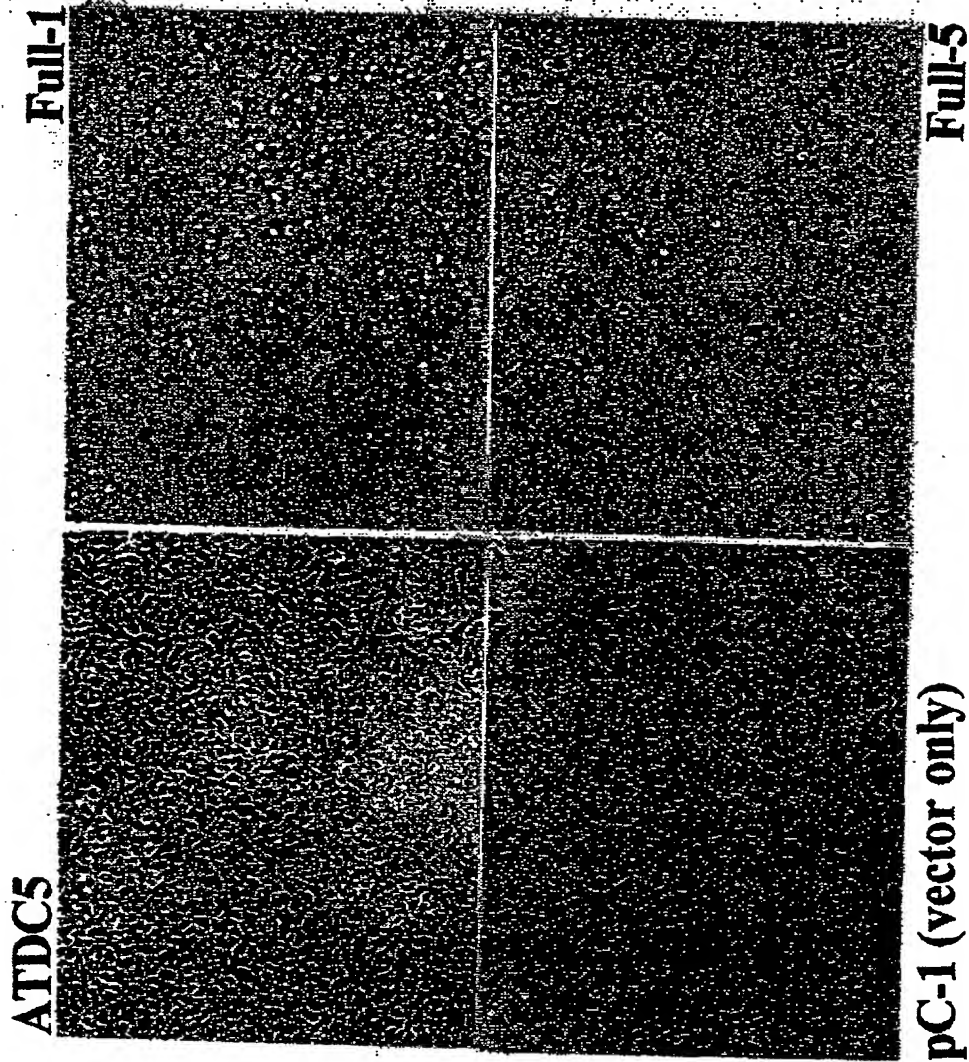
【図 3】



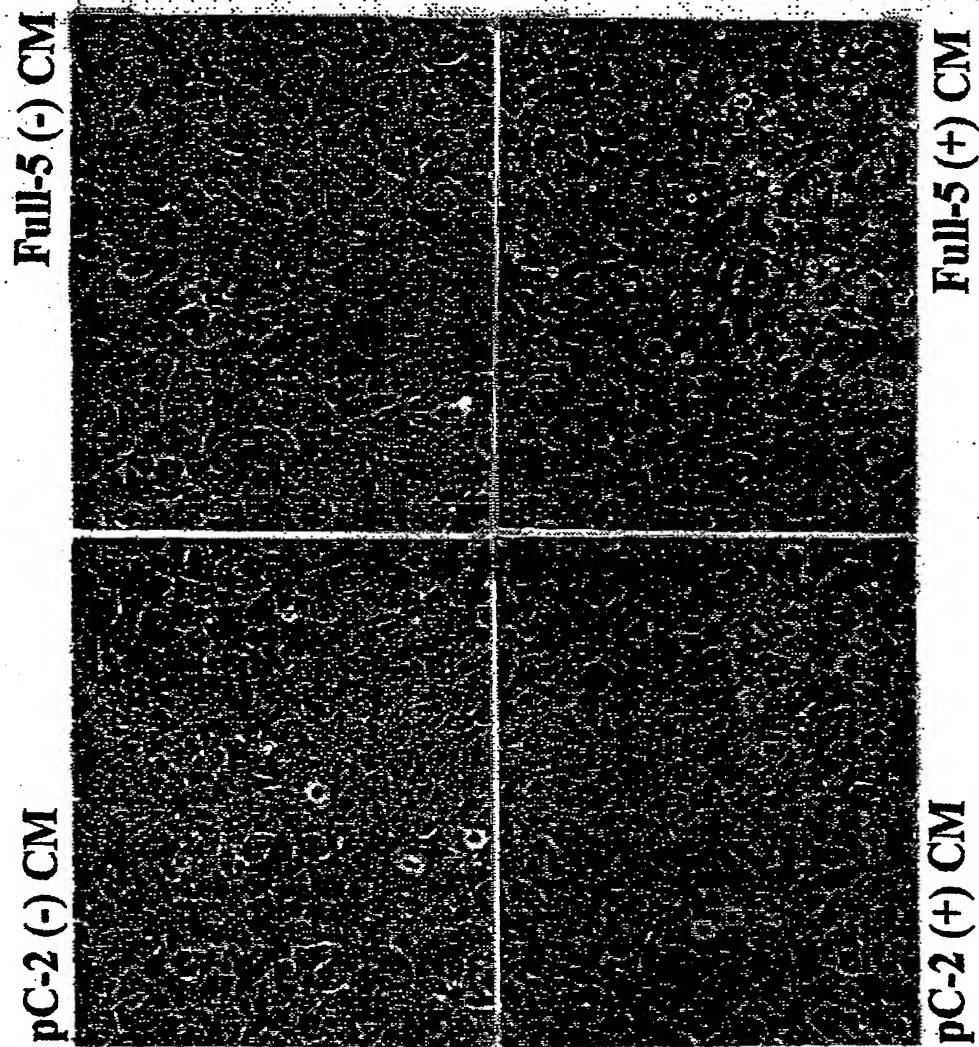
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 軟骨細胞の分化に関連する物質を明らかにし、さらにはこれを用いた新規な軟骨形成促進剤を提供する。

【解決手段】 MTfを含む軟骨形成促進剤。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社